

Carolina Mayumi Cavalcanti Taguchi

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO CITOTÓXICO DE
AGENTES CLAREADORES SOBRE A CULTURA DE
CÉLULAS-TRONCO DE DENTES HUMANOS: ESTUDO
PILOTO**

Dissertação submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia da
Universidade Federal de Santa
Catarina para a obtenção do Grau de
Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Jussara Karina
Bernardon

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Narciso
Baratieri

Florianópolis
2016

Taguchi, Carolina Mayumi Cavalcanti

Avaliação in vitro do efeito citotóxico de agentes clareadores sobre a cultura de células-tronco de dentes humanos: Estudo piloto / Carolina Mayumi Cavalcanti Taguchi ; orientadora, Jussara Karina Bernardon ; coorientador, Luiz Narciso Baratieri. - Florianópolis, SC, 2016.

71 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Inclui referências

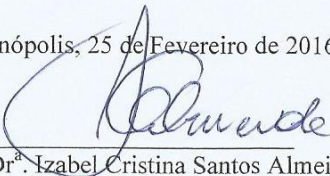
1. Odontologia. 2. Agentes clareadores. 3. Citotoxicidade. 4. Células-tronco. I. Bernardon, Jussara Karina. II. Baratieri, Luiz Narciso. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

Carolina Mayumi Cavalcanti Taguchi

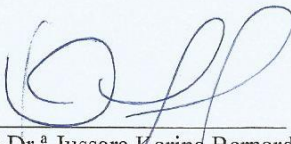
**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DO EFEITO CITOTÓXICO DE
AGENTES CLAREADORES SOBRE A CULTURA DE
CÉLULAS-TRONCO DE DENTES HUMANOS: ESTUDO
PILOTO**

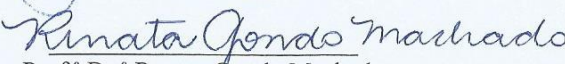
Esta Dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa Pós-Graduação em Odontologia.

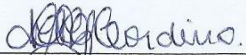
Florianópolis, 25 de Fevereiro de 2016.

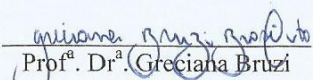

Prof.^a Dr.^a Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:


Prof.^a Dr.^a Jussara Karina Bernardon
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof.^a Dr.^a Renata Gondo Machado
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof.^a Dr.^a Mabel Cordeiro
Universidade Federal de Santa Catarina


Prof.^a Dr.^a Greciana Bruzi
Universidade Federal de Alfenas

Este trabalho é dedicado aos meus
queridos pais, amigos e professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à *Deus* em primeiro lugar e à *Nossa Senhora Aparecida* por guiarem meu caminho.

Agradeço aos meus pais *Telma* e *Shinki* por não medirem esforços para eu alcançar meus sonhos, sem eles eu não teria chegado até aqui.

Agradeço ao meu irmão *Felipe* por sempre me apoiar e incentivar mesmo estando longe.

Agradeço a todos meus familiares em especial meus padrinhos *Amélia* e *Olavo* por todo o amor e incentivo.

Agradeço à Universidade Federal de Santa Catarina por me acolher em mais uma jornada.

Agradeço a minha orientadora *Jussara Karina Bernardon* por confiar e acreditar em mim e participar tão intensamente da minha vida.

Agradeço ao meu coorientador *Luiz Narciso Baratieri* por sempre me incentivar com carinho e conselhos.

Agradeço às professoras *Renata Machado*, *Mabel Cordeiro*, *Greciana Bruzi* e *Sheila Stolf* por aceitarem meu convite em participar da banca de defesa.

Agradeço aos professores *Sylvio Monteiro Junior*, *Guilherme Carpena Lopes*, *Hamilton Pires Maia*, *Luiz Clóvis Cardoso Vieira*, *Cléo Nunes de Sousa* e *Beatriz Barros* por todos os ensinamentos e amizade.

Agradeço aos meus colegas de mestrado *Andria*, *Renata*, *Maynara*, *Vitor*, *Alfonso* e *Alana* por tudo que passamos juntos nesses dois anos intensos.

Agradeço aos professores de mestrado *Mara Felipe*, *Michele Bolan*, *Mariane Cardoso*, *Renata Castro*, *Mirelle Finkler* e professores convidados por todos ensinamentos.

Agradeço a coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia *Izabel Cristina Almeida* por se dedicar em tornar nosso programa cada vez mais forte.

Agradeço ao professor *Paulo Fernando Dias* responsável pelo Laboratório de Estudos em Bioatividade e Morfogênese Animal (LEBIMA) por compartilhar o laboratório e possibilitar a realização deste trabalho.

Agradeço aos funcionários *Vanessa do Laboratório Multiusuários do BEG (LAMEB)*, *Eliane do Laboratório de Microscopia Eletrônica (LCME)* e *Thiago do Laboratório de Patologia Bucal (LPB)* que me ajudaram a tornar este trabalho viável.

Agradeço a *Dona Léa* por todo o carinho e atenção, pelos cafés e por não medir esforços em nos ajudar sempre que precisamos.

Agradeço aos meus amigos e colegas de profissão *Silvana Batalha*, *Ana Clara Padilha*, *Martha Klasener*, *Luiza Rigotti* e *Elisa Oderich* pela amizade e por estarem sempre por perto quando preciso.

Agradeço a galera do futebol e do surf *Jéssica e Lucas*, *Karina e Arley*, *Nanda e Diogo*, *Dai e Bruno* pelos momentos de alegria e descontração.

Agradeço as minhas amigas de infância *Fernanda Justus*, *Maira Mieko*, *Luiza Tzaschel* e *Márcia Morelli* por acreditarem nos meus sonhos e sempre me apoiarem nas minhas loucuras.

Agradeço a todos meus colegas de mestrado e doutorado *Gabrielle*, *Bruna*, *Shizuma*, *Vanessa*, *Larissa*, *Ludimilla*, *Cristina*, *Camila*, *Renan*, *Karla*, *Fernanda*, *Tamires* e *Sheila*.

Agradeço a todos amigos cujo não citei o nome mas vibram com minhas conquistas e estão presentes em meu coração....

“Tenha coragem de seguir seu coração e intuição,
de alguma maneira eles já sabem o que você
realmente quer se tornar.”

(Steve Jobs)

RESUMO

A eficácia do clareamento dental já é um consenso na literatura. No entanto, ainda há dúvidas quanto sua segurança. Sabe-se que os íons hidroxila e radicais livres provenientes do clareamento dental são tóxicos e capazes de difundir-se tecidos dentinários, alcançando a polpa dentária. Quando em contato com o tecido pulpar podem provocar danos pulpares irreversíveis, como a necrose da polpa. Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* os efeitos citotóxicos de agentes clareadores sobre a cultura de células-tronco da polpa dental humana (DPSC). Dezesesseis terceiros molares humanos foram selecionados e seccionados transversalmente 2 mm aquém da junção amelodentinária. As coroas dentais foram limpas e inseridas em recipientes plásticos contendo 1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino. Três agentes clareadores foram testados: peróxido de carbamida 10% de aplicação caseira (Opalescence PF, Ultradent e PowerBleaching, BM4) e peróxido de hidrogênio 38% de aplicação de consultório (Opalescence Boost, Ultradent). Os agentes clareadores foram aplicados na superfície oclusal das coroas dentais, de acordo com os grupos (n=4): PB10 (PowerBleaching), 14 aplicações consecutivas de 2 horas; OP10 (Opalescence PF), 14 aplicações consecutivas de 2 horas; OP38 (Opalescence Boost), 2 aplicações consecutivas de 45 minutos; e C – controle, sem aplicação. Para avaliação da citotoxicidade foi realizado o teste de viabilidade celular (ensaio Metiltetrazolium – MTT) e os dados analisados estatisticamente (ANOVA e Teste Tukey com 5% de significância). Observou-se redução da viabilidade celular para todos os grupos, diferindo estatisticamente do grupo controle ($p<0,05$). Os grupos PB10 (59,34%) e OP10 (61%) não apresentaram diferença estatística significativa entre si ($p=0,1$), porém apresentaram maior viabilidade celular comprado ao grupo OP38 (17,40%), diferindo estatisticamente ($p<0,05$). Por meio dos resultados obtidos concluiu-se que os agentes clareadores apresentam diferentes níveis de citotoxicidade à cultura de células DPSC. A toxicidade foi dependente do protocolo de aplicação, sendo mais severa para o agente clareador de alta concentração (PH38%).

Palavras-chave: Clareamento dental. Clareadores. Células-tronco. Toxicidade.

ABSTRACT

Tooth bleaching effectiveness is already a consensus in the literature. However, doubts about its safety still remain. It is known that hydroxyl ions and free radicals from bleaching agents are toxic and able to diffuse through dentinal tissues reaching dental pulp. When in contact with the pulp tissue may cause irreversible pulp damage, as necrosis. Therefore, the aim of this study was to assess *in vitro* the cytotoxic effects of diffused hydrogen peroxide on human dental pulp stem cells (DPSC). Sixteen human third molars were selected and sectioned 2 mm of amelo junction. The dental crowns were cleaned and placed in plastic vials containing 1 mL of medium culture without fetal bovine serum. Three bleaching agents were tested: 10% carbamide peroxide (Opalescence PF, Ultradent and PowerBleaching, BM4) and 38% hydrogen peroxide (Opalescence Boost, Ultradent). Bleaching agents were applied on the occlusal surface of each crown, according to groups (n=4): PB10 (PowerBleaching), 14 consecutive applications for 2 hours; OP10 (Opalescence PF), 14 consecutive applications for 2 hours; OP38 (Opalescence Boost), 2 consecutive applications of 45 minutes; C (Control), no application. To evaluate the cytotoxicity, a cell viability assay was performed (MTT assay) and analyzed statistically (ANOVA and Tukey Test with 5% significance). There was a reduction in cell viability for all groups, differing statistically from control group ($p < 0,05$). The groups PB10 (59,34%) and OP10 (61%) showed no statistically significant difference between them ($p = 0,1$), but showed higher cell viability difference compared to OP38 group (17,40%). It may be concluded that bleaching agents exhibit different levels of cytotoxicity to DPSC. Toxicity was dependent on protocol application, being more severe for bleaching agent of high concentration (PH38%).

Keywords: Tooth bleaching. Bleaching agents. Stem cells. Toxicity.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Resumo das técnicas de clareamento de dentes vitais.....	26
Tabela 2 – Lote, marca comercial, composição e utilização dos agentes clareadores.....	41
Tabela 3 – Protocolo de aplicação por grupo.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Observação das células DPSC no microscópio de luz invertida.....	40
Figura 2 – Cultivo das células DPSC em estufa umidificada.....	40
Figura 3 – Contagem do número de células na câmara de Neubauer....	41
Figura 4 – Células sendo semeadas em placa de cultura de 12 poços...	41
Figura 5 – Confecção do dispositivo de resina acrílica.....	43
Figura 6 – Coroas dentais posicionadas em recipientes plásticos contendo meio de cultura.....	43
Figura 7 – Aplicação do agente clareador sobre a superfície oclusal....	43
Figura 8 – Remoção do agente clareador.....	44
Figura 9 – Aplicação do meio condicionado sobre a cultura de células.....	45
Figura 10 – Placa pronta para análise da viabilidade celular (ensaio MTT).....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3D – Tridimensional
CC – Contendo cálcio
CF – Sem Cálcio (do inglês, Calcium Free)
 cm^2 – Centímetro quadrado
 CO_2 – Dióxido de carbono
DMEM – Meio Eagle Modificado por Dulbecco
DMSO – Sulfóxido de dimetila
DPSC – Dental pulp stem cells
EDTA – Ácido Etilenodimino Tetra-acético
HDPC – Human dental pulp cells
HMDS - Hexametildissilazano
 HO_2^- - Ânion peridroxila
ISO – Organização Internacional para Padronização
Kg – Quilograma
L – Litro
LAD – Limite Amelodentinário
M – Molar
MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão
mg - Miligrama
min – Minuto
mL – Mililitro
mm – Milímetro
 mm^2 – Milímetro quadrado
mmol – Milimol
MTT – Ensaio de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio)
nm – Nanômetro
 $^{\circ}\text{C}$ – Graus Celsius
PBS – Solução tampão fosfato
PC – Peróxido de Carbamida
PH – Peróxido de Hidrogênio
PVC – Policloreto de Polivinila
UI – Unidade Internacional
 μg – Micrograma
 μL - Microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
\leq	Menor ou igual
=	Igual
<	Menor

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ESTENDIDA.....	25
1.1 Clareamento de dentes vitais.....	25
1.2 Sensibilidade dental.....	27
1.2.1 Difusão do peróxido de hidrogênio.....	28
1.2.2 Citotoxicidade celular.....	31
2 OBJETIVOS.....	37
2.1 Objetivo geral.....	37
2.1 Objetivo específico.....	37
3 METODOLOGIA ESTENDIDA	39
3.1 Obtenção dos elementos dentais.....	39
3.2 Cultivo das células-tronco.....	39
3.3 Tratamento clareador e Avaliação da citotoxicidade.....	41
3.3.1 Análise do metabolismo celular (Ensaio MTT).....	45
3.4 Tratamento estatístico.....	46
4 ARTIGO.....	47
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	61
BIBLIOGRAFIA.....	63
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	69
ANEXO A – Parecer Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos	71

1 INTRODUÇÃO ESTENDIDA

O clareamento dental está entre os tratamentos estéticos mais procurados no consultório odontológico. É um procedimento usualmente simples utilizado no tratamento de dentes com alteração de cor que, quando bem indicado, alcança excelentes resultados. Para dentes vitais, a eficácia clareadora pode ser acompanhada por efeitos adversos, como a sensibilidade dental. A sensibilidade é o efeito mais frequente e está associada à livre difusão de peróxido para o interior da câmara pulpar (DAHL; PALLESEN, 2003). A necessidade de compreender os possíveis efeitos citotóxicos dos íons hidroxila sobre o tecido pulpar tem aumentado o número de pesquisas na área de toxicidade clareadora, visto que há um consenso na literatura quanto a eficácia clareadora porém pouco sabe-se sobre a real segurança dos agentes clareadores.

1.1 Clareamento de dentes vitais

O clareamento de dentes vitais é um procedimento terapêutico que usualmente envolve a utilização de um agente químico oxidante, que a partir da sua reação, altera a natureza de absorção e reflexão da luz sobre a estrutura dental. Os agentes clareadores comumente utilizados são: peróxido de hidrogênio (PH) e peróxido de carbamida (PC), em concentrações que variam de 4 a 38% e 10 a 37%, respectivamente (ADA, 1998; KIHN, 2007; MINOUX; SERFATY, 2008).

O mecanismo de ação dos clareadores não está completamente elucidado, no entanto, sabe-se que a reação é baseada na utilização do peróxido de hidrogênio como agente ativo. Em condições alcalinas, o peróxido de hidrogênio sofre uma dissociação iônica e forma o ânion peridroxila (HO_2^-) que pode ser, por si só, a espécie ativa do processo de clareamento ou doador de elétrons para formação de radicais livres. O peróxido de carbamida, um composto originado de uma ligação fraca do peróxido de hidrogênio com ureia, é facilmente quebrado na presença de água liberando radicais livres e ureia, que é decomposta em dióxido de carbono e amônia (DAHL; PALLESEN, 2003; SULIEMAN, 2008).

Acredita-se que as moléculas que pigmentam a estrutura dental, conhecidas por cromóforos, sejam poderosos doadores de elétrons e representem o principal alvo de ação do peróxido. Quando suas extensas ligações conjugadas são interrompidas, a energia de absorção da molécula é modificada, alterando seu comprimento de onda de longo para curto. O comprimento de onda curto altera o espectro de absorção visível das moléculas que passam a refletir menos luz, levando à

formação de compostos menos cromatogênicos (JOINER, 2006; MINOUX; SERFATY, 2008).

Atualmente, quatro abordagens fundamentais podem ser citadas para o clareamento de dentes vitais: clareamento caseiro supervisionado; clareamento de consultório; clareamento combinado; e produtos de auto-aplicação. O clareamento caseiro foi descrito inicialmente na literatura por Haywood e Heymann em 1989. A técnica consiste na aplicação de baixas concentrações de peróxido de hidrogênio por meio da utilizando moldeiras plásticas individualizadas por 6 a 8 horas diárias. O clareamento de consultório, por sua vez, tem sido realizado desde 1930, consistindo na aplicação de altas concentrações de peróxido de hidrogênio aplicado semanalmente pelo cirurgião-dentista no consultório. Em 1991, as técnicas de clareamento e materiais foram registrados pela Associação Dental Americana (ADA) em forma de orientações (KIHN et al., 2007; SULIEMAN, 2008).

A escolha da técnica a ser utilizada deve levar em consideração uma série de fatores, como o tipo de descoloração e a severidade do escurecimento; o risco de sensibilidade dentinária; o tempo disponibilizado para o tratamento; e o estilo de vida e preferências do paciente. Um resumo das técnicas clareadoras pode ser observado na Tabela 1 (KIHN et al., 2007; JOINER et al., 2006; MINOUX; SERFATY, 2008).

TABELA 1 – Resumo das técnicas de clareamento de dentes vitais

	CLAREAMENTO CASEIRO	CLAREAMENTO CONSULTÓRIO	CLAREAMENTO COMBINADO	PRODUTOS CLAREADORES
<i>Agente clareador</i>	PC 10%-22% OU PH 4%-10%	PH 25%-38% OU PC 37%	PH 25%-38% ou PC 37% E PC 10%-22% ou PH 4%-10%	Baixas concentrações de PH (3 a 6%)
<i>Modo de aplicação</i>	- Moldeira individual personalizada	- Proteção dos tecidos moles - Aplicação no consultório	- Aplicação no consultório E - Moldeira individual personalizada	- Moldeiras pré- fabricadas - Tiras/fitas - Pínel
<i>Tempo de aplicação</i>	Até 8 h/dia	45 min por aplicação (semanal OU diária)	45 min (semanal OU diária) E Até 8 h/dia	De acordo com o fabricante
<i>Duração do tratamento</i>	Até 6 ou 8 semanas	Até 6 consultas	1 a 2 consultas E 2 a 3 semanas	Até 2 semanas

Independente da técnica clareadora, a sensibilidade dental é o efeito colateral mais frequente do clareamento de dentes vitais e é decorrente da livre difusão de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar que, ao atingir a polpa, provoca uma reação inflamatória reversível. Acredita-se que a sensibilidade dentinária possa ser potencializada pela exposição de dentina radicular ou lesões de cáries, no entanto, sabe-se que não é provocada por tais fatores (DAHL; PALLESEN, 2003; KIHN, 2007).

1.2 Sensibilidade dental

Em média, a sensibilidade dental atinge 11 a 93% dos pacientes que utilizam peróxido de carbamida 10%. A primeira manifestação ocorre após o quarto dia de tratamento e, usualmente, persiste por 5 dias (SULIEMAN, 2008). Um estudo clínico, duplo-cego, randomizado, buscou avaliar a fonte, a duração e o tempo de sensibilidade durante 14 dias de tratamento clareador. Constatou-se que 53% dos pacientes relataram algum tipo de experiência dolorosa, sendo a sensibilidade ao quente e ao frio mais frequentes. Dentre os pacientes que relataram sensibilidade, 77% reportaram dor por três ou mais dias. Tais resultados podem estar relacionados ao fato de haver variação dos níveis de percepção dolorosa de pessoa para pessoa (BROWNING et al., 2007).

Estudos clínicos buscam correlacionar as diferentes técnicas clareadoras (consultório e caseiro) e a concentração dos agentes clareadores (PH e PC) com as diferentes percepções dolorosas relatadas pelos pacientes. Bernardon et al. (2010) compararam a performance clínica de três técnicas clareadoras (clareamento caseiro, clareamento de consultório e clareamento combinado) e observaram maior grau de sensibilidade pela técnica de consultório imediatamente após o tratamento clareador com PH 38%, independente da utilização de fonte luminosa.

Basting et al. (2012), por sua vez, ao comparar a eficácia e a sensibilidade dental de agentes clareadores caseiro (PC 10% e PC 20%) e de consultório (PH 35% e PH 38%), observaram prevalência significativa de sensibilidade durante o clareamento com PC 20% (71,4% dos pacientes) comparado com o PH 35% (47,6% dos pacientes) e o PH 38% (15% dos pacientes). O fato do agente clareador de maior concentração ter apresentado menor grau de sensibilidade pode estar relacionado à composição química do material e/ou ao tempo de contato do agente clareador com a estrutura dental.

Resultado controverso foi observado em estudo clínico randomizado que buscou determinar a relação entre a sensibilidade dental e as variáveis: concentração do agente clareador, ativação por luz e espessura do elemento dental; no clareamento dental de consultório. Observou-se que o aumento da sensibilidade dental foi diretamente proporcional ao aumento da concentração do agente clareador, imediatamente após o tratamento clareador. A ativação por luz e a espessura do elemento dental não tiveram correlação com a sensibilidade dental após o final do tratamento clareador (MONCADA et al., 2013).

Além da sensibilidade dental, a difusão de peróxido de hidrogênio pelos tecidos dentários mineralizados pode provocar danos pulpare irreversíveis, incluindo necrose pulpar. O baixo peso molecular dos íons hidroxila e de seus subprodutos favorecem a difusão e, quando em contato com a polpa dental, são capazes de alterar o metabolismo celular. Há relatos na literatura que a presença de restauração, a ativação por luz, a concentração do agente clareador e o tempo de contato com a superfície dental podem influenciar a difusão de peróxido e, consequentemente, a citotoxicidade celular (GÖKAY et al., 2000; BENETTI et al., 2004).

1.2.1 Difusão de peróxido de hidrogênio

Um fator controverso que pode influenciar a difusão de peróxido é a utilização de luz para ativação do agente clareador. Em 1987, Bowles e Ugwuneri buscaram quantificar, *in vitro*, a difusão de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar de agentes clareadores com diferentes concentrações e ativados por diferentes fontes luminosas. Os autores observaram que a difusão de peróxido, em dentes humanos anteriores, foi maior para a concentração de PH 30%, no entanto, não diferindo estatisticamente do PH 10%. Quando avaliada a utilização de fonte de luz observou-se que o aumento da temperatura de 37°C para 50°C aumentou a difusão de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar.

Resultado controverso foi observado por Kwon et al. (2013), que buscaram avaliar a influência do protocolo de ativação por luz na eficácia clareadora e na difusão de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar. Dentes caninos humanos foram submetidos a sessões clareadoras com PH 40%, sob ou sem ativação por luz. Observou-se alteração de cor e penetração de peróxido com e sem a utilização de fonte de luz, porém não houve diferença estatística entre os

grupos. Ambos os protocolos foram eficazes no clareamento dental, não havendo correlação entre a alteração de cor e os níveis de difusão.

Dentre os diversos estudos que buscam avaliar a difusão de peróxido para o interior da câmara pulpar, a maioria é conduzido *in vitro* utilizando dentes humanos. No entanto, há relatos de estudos utilizando dente bovino devido à sua similaridade com o dente humano. Camargo et al. (2007) buscaram avaliar a difusão de PH 38% pelos tecidos dentários humano e bovino. Observou-se que a taxa de difusão de peróxido foi maior nos dentes humanos comparado aos dentes bovinos. Tal resultado pode ser explicado pelo fato de que mesmo apresentando similaridades, a espessura de dentina e a morfologia entre os dentes humanos e bovinos são diferentes. Os dentes humanos apresentam menor espessura de dentina, facilitando a difusão; ao passo que os dentes bovinos apresentam menor permeabilidade devido ao diâmetro dos túbulos dentinários ser menor próximo à polpa. Outro fator que pode influenciar a difusão de peróxido são as alterações químicas que os agentes clareadores promovem sobre a estrutura dental, as quais são diferentes para os dentes humanos e bovinos.

No mesmo estudo, os autores buscaram avaliar se a presença de restauração e o tipo de material restaurador influenciariam a difusão de peróxido. Observou-se que a difusão foi maior nos dentes restaurados quando comparado aos dentes intactos, sendo maior quando utilizado ionômero de vidro modificado (CAMARGO et al., 2007). Resultado similar foi observado por Patri et al. (2013), que buscaram avaliar a penetração pulpar de peróxido (PC 10%) através de dentes humanos intactos e restaurados com resina composta e ionômero de vidro modificado por resina. Os autores observaram maior difusão de peróxido para os dentes restaurados (média 7,74µg) comparado aos dentes intactos (média 3,33µg), diferindo estatisticamente. Tal fato está associado à propriedade de microinfiltração dos materiais restauradores. Apesar dos materiais não terem diferido estatisticamente, os dentes restaurados com resina composta apresentaram menores níveis de peróxido pulpar devido ao forte selamento marginal obtido pela aplicação do sistema adesivo.

Visto que a presença de restauração aumenta a difusão de peróxido para o interior da câmara pulpar, Gökay et al. (2000) buscaram comparar a difusão de diferentes concentrações de peróxido de carbamida (PC 10%, 15% e 35%) em dentes intactos e restaurados. Observou-se que os agentes clareadores penetram em maior quantidade nos dentes restaurados comparado aos dentes intactos, independente da concentração utilizada. Supõe-se que a profundidade e o tamanho da

restauração, assim como o tempo de aplicação dos agentes clareadores podem afetar a taxa de difusão. Em estudo similar, Benetti et al. (2004) observaram que as margens das restaurações podem ser consideradas um caminho possível da penetração de peróxido de hidrogênio para o interior da câmara pulpar e há uma correlação positiva entre o aumento da permeabilidade de peróxido e o aumento da concentração dos agentes clareadores.

Visto os resultados controversos quanto aos diferentes agentes clareadores, Cooper et al. (1992) buscaram comparar a difusão de peróxido de géis clareadores à base de peróxido de hidrogênio e peróxido de carbamida para o interior da câmara pulpar de dentes humanos anteriores. Os géis à base de hidrogênio penetraram em maior volume comparado com os géis à base de carbamida. Os autores concluíram que a taxa de difusão é de certa forma limitada e não é proporcional à concentração de peróxido de hidrogênio contido nos géis clareadores.

Resultados similares foram obtidos no estudo de Thitinthapan et al. (1999), que compararam a difusão de peróxido de três diferentes marcas comerciais de agentes clareadores à base de peróxido de carbamida 10%. Dentes pré-molares humanos intactos foram expostos a um dos géis clareadores à base de PC 10%: Opalescence (Ultradent Products); Sparkle (Kuron Health Products Corp.); e Rembrandt Lighten (Den-Mat). Os autores observaram que as taxas de difusão tiveram diferença estatística entre as marcas comerciais. O gel clareador Opalescence obteve a maior taxa de difusão, seguido dos géis Sparkle e Rembrandt. Tal resultado pode explicar o fato da eficácia clareadora e as taxas de sensibilidade serem diferentes para agentes clareadores contendo a mesma concentração de peróxido.

Em estudo *in vitro*, ¹Soares et al. (2014) avaliaram e correlacionaram o efeito clareador e a difusão de peróxido de hidrogênio de diferentes protocolos clareadores de consultório. Discos de dentina e esmalte obtidos de dentes bovinos anteriores foram pigmentados com chá preto e clareados utilizando agentes clareadores de PC 37%, PH 35% e PH 17,5%, com diferentes tempos de aplicação. Os autores observaram que a aplicação de PH 35% por 15 min ou PH 17,5% por 45 min (3x15min) produziu efeito clareador similar ao PH 35% por 45 min, porém reduziram significativamente a difusão de PH pelo esmalte e dentina. O gel PC 37%, ao final do tratamento, obteve eficácia clareadora similar aos produtos à base de PH e redução da difusão de peróxido.

Resultado controverso foi avaliado recentemente por Mena-Serrano et al. (2015) que buscaram avaliar a difusão de diferentes composições e concentrações de peróxido de hidrogênio no clareamento de consultório. Agentes clareadores à base de peróxido de hidrogênio livres de cálcio e contendo cálcio, nas concentrações de 35% e 20%, foram aplicados segundo as normas dos fabricantes. Observou-se maiores níveis de difusão de peróxido quando realizada a aplicação de agentes clareadores contendo cálcio, independente da concentração. Os autores afirmaram que a difusão de PH é dependente do protocolo de aplicação e da composição do agente clareador, sendo a concentração do produto menos importante.

Marson et al. (2015) também correlacionaram a difusão de peróxido para o interior da câmara pulpar com o tempo de aplicação do gel clareador sobre a estrutura dental. Os autores buscaram avaliar a taxa de degradação e a difusão de agentes clareadores à base de peróxido de hidrogênio após diferentes tempos de aplicação. Diferentes marcas comerciais de PH 35% e PH 38% foram avaliados após quatro tempos de aplicação: imediatamente, 15 minutos, 30 minutos e 45 minutos. Todos os agentes clareadores tiveram diminuição da taxa de degradação ao longo do tempo, mantendo 86% da sua concentração inicial de peróxido de hidrogênio após 45 minutos. A difusão de peróxido foi intensificada pelo aumento do tempo de contato do agente clareador com a superfície dental, diferindo estatisticamente, para todos os produtos avaliados.

Visto que a capacidade do peróxido de hidrogênio em difundir-se pelos tecidos dentários está fortemente relacionada ao protocolo de aplicação e à composição do agente clareador, torna-se de extrema importância compreender os potenciais danos causados ao tecido pulpar e buscar estabelecer protocolos seguros para o clareamento de dentes vitais.

1.2.2 Citotoxicidade celular

Sabe-se que o peróxido de hidrogênio é citotóxico quando em contato com as células pulpares, reduzindo sua proliferação e metabolismo celular. Há relatos de que os íons hidroxilas agem como radicais livres sobre a membrana celular, sendo capazes de induzir a morte celular por apoptose, reação conhecida como peroxidação lipídica (COSTA; HUCK, 2006). Desta forma, diversos estudos têm buscado quantificar e avaliar a viabilidade, morte e as alterações celulares frente à aplicação dos agentes clareadores. Para tal, podem ser realizados

ensaios colorimétricos como o teste de azul Trypan e o ensaio Metil Tetrazolium (MTT); análise da morfologia celular em microscópio eletrônico de varredura (MEV) ou microscópio eletrônico de transmissão (MET); e análise da morte celular em microscópio de fluorescência.

Estudos *in situ* realizados por Cohen (1979) e Robertson (1980) buscaram avaliar alterações histológicas do tecido pulpar frente ao clareamento dental utilizando PH 35%. Após as sessões clareadoras, os dentes pré-molares foram extraídos e o tecido pulpar foi preparado para análise histológica em microscópio óptico de luz. Os autores não observaram alterações pulpares significativas, considerando o PH 35% inofensivo ao tecido pulpar. Resultado similar foi observado por Kina et al. (2010) que não observaram danos ao tecido pulpar de pré-molares após o tratamento clareador utilizando PH 38%, com ou sem aplicação de luz.

Resultado controverso foi observado por Costa et al. (2010) que avaliaram a resposta pulpar de incisivos e pré-molares humanos submetidos ao clareamento de consultório com PH 38%. Os autores observaram alterações teciduais com ampla zona de necrose por coagulação na polpa dentária de incisivos inferiores, mas não de pré-molares. Houve relato de sensibilidade pós-aplicação apenas para os dentes anteriores, levando os autores a concluir que pode haver uma correlação entre o grau de sensibilidade e as alterações do tecido pulpar.

Roderjan et al. (2015) também avaliaram a resposta pulpar de incisivos inferiores humanos submetidos ao clareamento de consultório com PH 35% contendo cálcio (CC) e sem cálcio (CF). Na avaliação histológica, o grupo controle (sem aplicação) não apresentou alterações. Já os grupos CF apresentaram dentes com presença de necrose por coagulação no tecido pulpar coronário. O grupo CC não apresentou necrose, apenas zonas de inflamação moderada e deposição de dentina reacionária. Assim como os demais estudos, concluiu-se que o PH 35% causou danos pulpares intensos, independentemente do modo de aplicação.

Por meio da análise histológica do tecido pulpar de ratos, Cintra et al. (2013) observaram alterações por resposta inflamatória e desorganização tecidual em todos os espécimes submetidos ao tratamento clareador. Observou-se ainda que, acima de 4 sessões de clareamento, a polpa coronária de todos os espécimes apresentaram necrose pulpar. Os autores concluíram que o clareamento dental em ratos causa dano pulpar e o grau de dano aumenta com o número de sessões clareadoras. Resultado similar foi observado em estudo *in vitro*

que avaliou os efeitos dos produtos clareadores sobre tecidos orgânicos 3D pela caracterização das alterações da morfologia e do comportamento celular. Os autores observaram que os agentes clareadores podem provocar alterações teciduais na morfologia, apoptose e proliferação dos queratinócitos, e concluíram que essas alterações estão ligadas à produção de citocinas pró-inflamatórias que mantêm o tecido em um estado ativo crônico (LUCIER et al.; 2013).

Em 2009, Coldebella et al. realizaram o primeiro de uma série de estudos que buscaram avaliar a citotoxicidade dos tratamentos clareadores por meio da cultura de células de linhagem odontoblástica de camundongo (MDPC-23). Os autores avaliaram a viabilidade celular (ensaio MTT) após a aplicação de agentes clareadores à base de PH 35%, com e sem ativação por luz, sobre discos de esmalte e dentina de dentes bovinos. Houve redução do metabolismo celular após a utilização do agente clareador, independente da utilização de luz. Concluiu-se que o PH 35% é capaz de difundir-se pelo esmalte e dentina, causando efeitos tóxicos à cultura de células MDPC-23.

O potencial citotóxico da ativação por luz do PH 35% sobre a cultura de células MDPC-23 foi investigada por Dias Ribeiro et al. (2009). Observou-se maiores efeitos citotóxicos quando o agente clareador foi ativado por luz, porém não houve diferença significativa comparado à utilização do agente clareador sem ativação. Resultado similar foi observado por Trindade et al. (2009). Os autores avaliaram o efeito citotóxico da aplicação de PH 35% sobre a cultura de células odontoblásticas (MDPC-23) com e sem ativação por luz. Não houve diferença estatística entre os grupos, sugerindo que o gel clareador foi tóxico para a cultura de células, independente da aplicação de luz.

Buscando compreender se o tempo de contato do agente clareador com a estrutura dental é capaz de interferir na toxicidade pulpar, Soares et al. (2013) buscaram avaliar e correlacionar a eficácia clareadora e a citotoxicidade do PH 35% após diferentes tempos de aplicação. Os autores observaram que o tempo de aplicação de 45 minutos apresentou maior alteração de cor ($\Delta E=8,59$), porém causou maior efeito citotóxico à cultura de células MDPC-23 (redução de 40,42% da viabilidade celular). A diminuição do tempo de contato diminuiu a eficácia clareadora porém, quando aplicado por 15 minutos, a alteração foi clinicamente aceitável ($\Delta E>3,3$) e a citotoxicidade foi quase zero (viabilidade 99%).

De Almeida et al. (2015) buscou comparar a eficácia clareadora e a citotoxicidade de agentes clareadores à base de peróxido de hidrogênio contendo diferentes concentrações. O PH 35% e o PH 20%,

disponíveis no mercado, foram avaliados após 7, 21 e 28 dias de tratamento e obtiveram eficácia clareadora estatisticamente similar. Observou-se redução da viabilidade celular em comparação com o controle, sendo aproximadamente 37,10% para o PH 35% e 20% para o PH 20%. Tal diferença foi associada à composição dos agentes clareadores, o PH 20%, que contém cálcio na sua formulação, diminuiu a difusão de peróxido para o interior da câmara pulpar.

De Lima et al. (2009), avaliaram o efeito citotóxico de agentes clareadores à base de peróxido de carbamida com diferentes concentrações sobre a cultura de células MDPC-23. Os autores observaram que, em concentrações mais elevadas, o peróxido de carbamida reduziu o metabolismo celular em 78%. Já nas concentrações mais baixas, o metabolismo foi reduzido em 38,5% e 17,6%. Concluiu-se que, independente da concentração, o peróxido de carbamida foi capaz de difundir-se pelo esmalte e dentina sendo tóxico para a cultura de células. Em 2010, Lima et al. buscaram comparar o efeito citotóxico transdentário do PC 10% e 16% sobre a cultura de células MDPC-23. Observou-se que o PC 16% apresentou maior difusão de peróxido e redução significativa do metabolismo celular comparado ao PC 10%, que não diferiu estatisticamente do grupo controle (sem aplicação de agente clareador).

Soares et al. (2011), buscaram avaliar a citotoxicidade do PC 10% e 16% sobre a cultura de células odontoblásticas (MDPC-23) após diferentes tempos de aplicação. Os agentes clareadores foram aplicados por 8 horas diárias, durante os períodos de 1, 7 e 14 dias de tratamento. Não houve diferença significativa entre o controle (sem aplicação) e os grupos clareados com PC 10% em todos os períodos de avaliação. Já para o PC 16% houve diferença estatística para todos os tempos avaliados em comparação ao grupo controle. Concluiu-se que o PC 10% não menos citotóxico para a cultura de células, diferindo do PC 16% que foi tóxico já após a primeira aplicação. Resultado controverso foi observado por Lima et al. (2013) que buscaram avaliar o efeito citotóxico de sucessivas aplicações de PC 10% e compará-las com uma aplicação de PH 35%. Observou-se que uma aplicação por 8 horas de PC 10% não causou redução significativa no metabolismo das células MDPC-23. No entanto, a aplicação consecutiva de PC 10% promoveu toxicidade severa à cultura de células, apresentando efeito citotóxico maior do observado após uma aplicação de PH 35%.

Visto que o tempo e a concentração do agente clareador influencia diretamente a citotoxicidade celular, Soares et al. (2016) buscaram avaliar o efeito de diferentes tempos de aplicação de PH

17,5% e a resposta a longo prazo da cultura de células MDPC-23. Observou-se difusão de peróxido de hidrogênio para todos os grupos, proporcional ao tempo de aplicação. Redução de aproximadamente 31%, 21% e 13% da viabilidade celular foi observado para os grupos 45, 15 e 5 minutos, respectivamente. No entanto, os autores observaram que as células foram capazes de recuperar suas funções após 21 dias da aplicação do agente clareador, independentemente do tempo de aplicação.

Apesar das células de camundongo MDPC-23 terem fenótipo similar ao de odontoblastos vivos e serem indicadas para avaliar a citotoxicidade de produtos *in vitro*, ainda busca-se características mais próximas à situação clínica real. Para tal, Caviedes-Bucheli et al. (2008) buscaram avaliar o efeito de diferentes protocolos de clareamento dental na expressão da substância P (SP) na polpa dental de pré-molares humanos, extraídos após o clareamento dental. A substância P é um neuropeptídeo que tem por função induzir a vasodilatação e o aumento do fluxo sanguíneo, permitindo a chegada de células e mediadores inflamatórios. A SP foi encontrada de forma expressiva em todas as amostras pulpare, sendo que maiores níveis foram observados quando utilizou-se fonte de luz para ativação do agente clareador. Clinicamente, os resultados encontrados são relevantes, pois sugerem o desenvolvimento de um processo inflamatório, que pode ser severo ou passageiro.

Outra forma de aproximar os resultados à situação clínica é por meio da realização de estudos *in vitro* utilizando células-tronco. As células-tronco são definidas como células que têm capacidade de perpetuar a si mesmas indefinidamente por meio de auto-renovação e gerar células maduras (MIURA et al., 2003). Gronthos et al. (2000) relataram a existência do primeiro nicho de células-tronco envolvendo dentes humanos. As células-tronco obtidas a partir das células pulpare humanas de dentes permanentes foram denominadas DPSCs (*Dental Pulp Stem-Cells*), demonstrando ter grande potencial de proliferação. Dentre os nichos existentes na cavidade oral, as células DPSCs têm sido o principal alvo das pesquisas na área da odontologia, principalmente no campo da engenharia tecidual (CORDEIRO et al., 2008; EGUSA et al., 2012).

²Soares et al., em 2014, realizaram o primeiro estudo comparando o efeito citotóxico do PH na cultura de células-tronco humanas da polpa dental humana (DPSC) e células MDPC-23. Para ambas as linhagens celulares houve uma redução da viabilidade celular e alteração da morfologia proporcional à concentração e aos períodos de

aplicação. A viabilidade das células DPSC imediatamente ao clareamento com PH 35% por 45 e 15 minutos foi de 3,1% e 6,9%, respectivamente. Nos grupos em que o PH 35% foi aplicado por 5 minutos ou aplicou-se PH 17,5%, a viabilidade variou de 13,9% a 34,9%. Em geral, a redução da viabilidade observada nas células MDPC-23 foi menos intensa da observada nas células DPSCs. Concluiu-se que a redução do tempo de aplicação ou redução da concentração produziram efeito clareador satisfatório com redução dos efeitos citotóxicos.

Resultados similares foram encontrados por Duque et al. (2014), que buscaram comparar a eficácia clareadora, a difusão de peróxido de hidrogênio e a citotoxicidade celular de agentes clareadores à base de peróxido de carbamida (PC 10%) e peróxido de hidrogênio (PH 35%). Os autores avaliaram o efeito citotóxico sobre a cultura de células HDPC e MDPC-23 e observou-se redução significativa da viabilidade celular para todos os grupos. A redução da viabilidade para o PC 10% e PH 35% foi de 24,6% e 92,6% para as células HDPC; e 18,8% e 77,3% para as células MDPC-23.

Quando avaliada a citotoxicidade imediata e a capacidade de recuperação das células-tronco da polpa dental humana (DPSCs), autores observaram que os fatores concentração e frequência tiveram um efeito significativo na viabilidade celular imediata após o clareamento dental. Em geral, quanto maior a concentração e mais longo o tempo de aplicação, maior a redução da viabilidade celular imediatamente após a aplicação e menor a capacidade de recuperação após 72 horas. Assim a citotoxicidade imediata foi dependente da concentração e, quanto menor, maior foi a capacidade de proliferação tardia das células pulpares (¹SOARES et al., 2015; ²SOARES et al., 2015).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar, *in vitro*, os efeitos citotóxicos de agentes clareadores difundidos pela estrutura dentária, sobre a cultura de células-tronco da polpa dental humana.

2.2 Objetivo Específico

- Avaliar a viabilidade celular de diferentes composições e concentrações de agentes clareadores (PC 10% e PH 38%) para o clareamento de dentes vitais.

3 METODOLOGIA ESTENDIDA

O trabalho foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, sob número de parecer 847.465 (Anexo A).

3.1 Obtenção dos elementos dentais

Foram obtidos 16 terceiros molares humanos, com rizogênese completa, extraídos por cirurgiões-dentistas alheios à pesquisa. A indicação terapêutica da exodontia, visando a melhoria da saúde do paciente, foi recomendada pelo próprio cirurgião-dentista que realizou o procedimento, devidamente documentado em prontuário. Os pacientes doadores foram esclarecidos sobre os riscos e benefícios, e conscientizados da doação do dente por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A).

Os dentes foram limpos e avaliados quanto à ausência de anomalias, cáries, restaurações e trincas. Em seguida, foram seccionados transversalmente 2 mm apical do limite amelodentinário (LAD). A secção foi realizada com disco diamantado sob refrigeração (11-4254, série 15 LC, Diamond Wafering blade, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA) na máquina de corte (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA). Os remanescentes coronais foram limpos com curetas e solução de hipoclorito de sódio 1% (ASFER, SP, Brasil) e acondicionados até sua utilização em recipientes de vidro contendo água destilada.

3.2 Cultivo das células-tronco

Para o experimento foram utilizadas células-tronco da polpa dental humana de dentes permanentes. As células primárias foram descongeladas e cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementado com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 100 IU/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina (Invitrogen), e 2 mmol/L de glutamina (Invitrogen). A renovação do meio de cultura foi realizada a cada 2 dias e a cultura foi mantida em incubadora com atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C (Figura 1 e 2). A subcultura foi obtida a partir do descolamento das células que estavam aderidas ao substrato plástico por meio da aplicação de 1,5 mL Tripsina e EDTA 0,05M em tampão

fosfato pelo tempo de 5 minutos na temperatura de 37°C. Avaliada o descolamento das células em microscópio óptico de luz, a tripsina foi neutralizada com 3 mL de meio de cultura e as células foram centrifugadas por 5 minutos até a formação de um pellet. Em seguida, as células foram resuspensas em 1 mL de DMEM contendo 10% de soro fetal bovino e contadas em microscópio óptico de luz invertida, utilizando-se para isto uma câmara de Neubauer (Figura 3). Assim, o repique das células foi realizado diversas vezes até que se obtivesse o número suficiente de células para realização da pesquisa (aproximadamente 2 milhões de células).

As células-tronco confluentes foram descoladas dos frascos, como já citado, e semeadas em placas de cultura. Para avaliação da citotoxicidade, aproximadamente 60.000 células/cm² foram semeadas em cada poço de placas de acrílico contendo 12 poços (Figura 4). As placas foram mantidas por 24 horas em incubadora atmosférica úmida à 37°C com 5% de CO₂ para adesão das células.

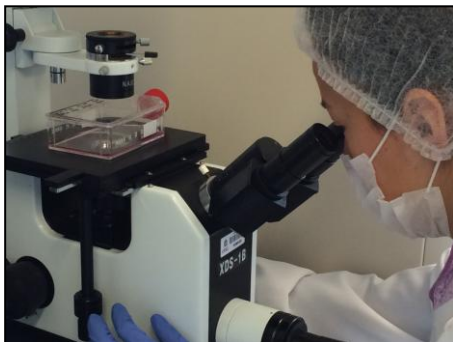


Figura 1 – Observação das células-tronco DPSC no microscópio de luz invertida



Figura 2 – Cultivo das células-tronco DPSC em estufa umidificada

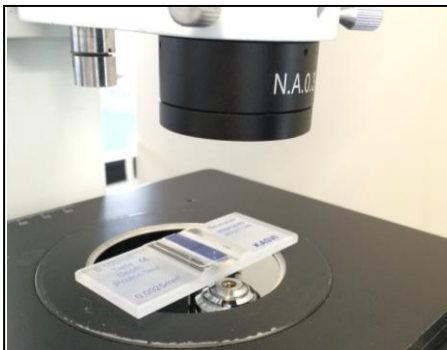


Figura 3 – Contagem do número de células na câmara de Neubauer

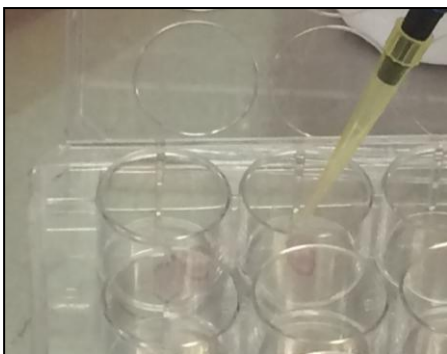


Figura 4 – Células sendo semeadas em placa de cultura de 12 poços

3.3 Tratamento Clareador e Avaliação da Citotoxicidade

As coroas dentais foram divididas em 4 grupos ($n=4$), de acordo com o tipo de agente clareador aplicado: GPB10 – Peróxido de Carbamida 10% (PowerBleaching – BM4); GOP10 – Peróxido de Carbamida 10% (Opalescent PF – Ultradent); GOP38 – Peróxido de Hidrogênio 38% (Opalescence Boost – Ultradent); e GC (controle) – sem aplicação. A marca comercial, a composição e a utilização dos agentes clareadores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2 – Lote, marca comercial, composição e utilização dos agentes clareadores

Grupo	Agente clareador (marca)	Composição/Lote	Utilização
PB10	Power Bleaching 10% (BM4)	Peróxido de Carbamida 10%; Oxalato de Potássio / Lote: 0010/0815	Caseiro

OP10	Opalescence PF (Ultradent)	Peróxido de Carbamida 10%; 0,25% Fluoreto de Sódio; 0,5% Nitrato de Potássio / Lote: D00KG	Caseiro
OP38	Opalescence Boost (Ultradent)	Peróxido de Hidrogênio 38%; < 20% Nitrato de Potássio; < 5% Hidróxido de Potássio; 1,1-1,5% Fluoreto de Sódio/ Lote: D00T3	Consultório
C	-	-	-

Um dispositivo (disco) de resina acrílica foi confeccionado com o objetivo de isolar a superfície oclusal da superfície pulpar e permitir a aplicação do agente clareador sem que houvesse escoamento do material (Figura 5). Para confecção dos discos, os dentes foram fixados no centro de uma placa de acetato com 2 cm de diâmetro e um orifício central compatível com o tamanho do elemento dental. A placa serviu como guia para que o disco de acrílico ficasse posicionado próximo ao LAD. Para auxiliar na padronização do disco de acrílico utilizou-se um anel de PVC com 2 mm de altura e mesmo diâmetro da placa de acetato. O anel foi posicionado sob a placa de acetato e preenchido com resina acrílica transparente (Dencrilon, Dencril, SP, Brasil). Após a polimerização, os conjuntos (dente e disco) foram autoclavados em uma cuba metálica contendo água deionizada, pelo período de 60 minutos, a 120°C e pressão de 1 Kg/força.

Previamente à aplicação do gel clareador, cada porção radicular do conjunto autoclavado (dente e disco) foi posicionada no centro de um recipiente plástico estéril com dimensões de 3,5 cm de diâmetro e 1,3 cm de altura que continha o volume de 1 mL de meio de cultura sem soro fetal bovino (Figura 6). Desta forma, os íons capazes de difundir-se pela estrutura dental ficariam aprisionados no meio de cultura. A quantidade de gel foi padronizada pela utilização de seringas plásticas volumétricas de 3 mL. Cerca de 0,1 mL de agente clareador foi aplicado sobre a superfície oclusal de cada elemento e espalhado com o auxílio de microaplicadores (Figura 7).



Figura 5 – Confecção do dispositivo de resina acrílica



Figura 6 – Coroas dentais posicionadas em recipientes plásticos contendo meio de cultura

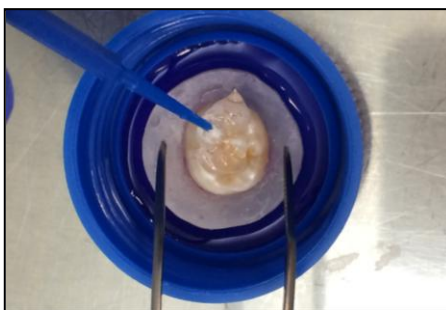


Figura 7 – Aplicação do agente clareador sobre a superfície oclusal

O protocolo de aplicação teve por objetivo simular duas semanas de tratamento clareador. Desta forma, para simular a técnica caseira com PC 10% (Grupo PB10 e OP10) foram realizadas 14 aplicações consecutivas de 2 horas, com intervalo de 10 minutos entre cada aplicação; e para simular a técnica de consultório com PH 38% (Grupo OP38) foram realizadas 2 aplicações consecutivas de 45 minutos contínuos, com intervalo de 10 minutos entre cada aplicação.



Figura 8 – Remoção do agente clareador

Independente da técnica de clareamento utilizou-se o mesmo protocolo para uma nova aplicação do produto. O gel clareador foi removido com auxílio de um pincel aplicador seguido da irrigação com água destilada. Um sugador cirúrgico foi posicionado para evitar o escoamento de líquido para o meio de cultura (Figura 8). Um resumo do protocolo de aplicação para cada grupo está descrito na Tabela 3.

Tabela 3 – Protocolo de aplicação por grupo

Grupo	No de aplicações consecutivas	Tempo de aplicação	Intervalo
PB10	14	2 horas	10 minutos
OP10	14	2 horas	10 minutos
OP38	2	45 minutos	10 minutos
Controle	Sem aplicação	-	-

Imediatamente após o término dos protocolos clareadores, o meio de cultura condicionado de cada recipiente (1 mL) foi aspirado e aplicado em um dos poços que continham as células DPSC previamente cultivadas (Figura 9). As células em contato com o meio condicionado, contendo agora os componentes do gel clareador que difundiram através do esmalte e dentina dos espécimes, foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂, 95% de ar e temperatura de 37°C por uma hora. O metabolismo celular foi avaliado pelo ensaio Metil Tetrazolium (MTT).



Figura 9 – Aplicação do meio condicionado sobre a cultura de células

3.3.1 Análise do Metabolismo Celular (Ensaio MTT)

Três espécimes de cada grupo experimental e do controle foram utilizados para a avaliação do metabolismo celular. Após o tempo de contato, o meio de cultura condicionado foi aspirado e as células foram submetidas a avaliação da viabilidade celular por meio do ensaio MTT, segundo a ISO 10993-5. Este método determina a atividade da enzima desidrogenase succínica produzida pelas mitocôndrias presentes nas células. Para a preparação da solução de MTT, 1 mL de solução salina de tampão fosfato (PBS, Invitrogen) foi adicionado a 5 mg do sal de metiltetrazolium (brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol.2-il]-2,5-difeniltetrazólio) fornecido pelo fabricante (MTT assay, Invitrogen, Carlsbad, CA), alcançando uma mistura final com coloração amarelada.

Sobre a cultura celular foi adicionado 10 μ L de solução de MTT e incubado em estufa umidificada na temperatura de 37°C, por 4 horas. Decorrido este período, a solução foi cuidadosamente aspirada e, então, foi adicionado 50 μ L de DMSO a cada poço com o objetivo de dissolver os cristais violeta resultantes da clivagem do anel do sal de metiltetrazolium pela enzima desidrogenase succínica da mitocôndria das células viáveis. Após agitação e verificação da homogeneidade, as soluções obtidas foram transferidas para uma placa de 96 poços para avaliação das diferenças de tonalidade violeta (Figura 10). A viabilidade celular foi avaliada de maneira proporcional à absorbância determinada a 570 nm em multileitora (Infinite M200, Tecan, Suíça).

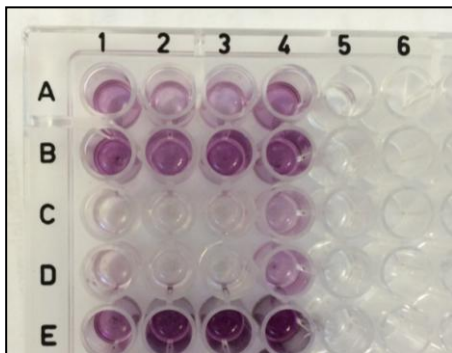


Figura 10 – Placa pronta para análise da viabilidade celular (Ensaio MTT)

3.4 Tratamento estatístico

Para o ensaio MTT, os valores obtidos em triplicatas foram convertidos em porcentagens de acordo com a absorbância média observada, considerando o grupo controle como 100% de viabilidade. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA para medidas repetidas e o Teste Tukey, com nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$).

4 ARTIGO

CITOTOXICIDADE DE AGENTES CLAREADORES A BASE DE PERÓXIDO DE CARBAMIDA 10% E PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO 38% SOBRE A CULTURA DE CÉLULAS-TRONCO DA POLPA DENTAL HUMANA

Relevância Clínica

A eficácia do clareamento dental já é um consenso na literatura, porém seus efeitos adversos ainda preocupam pacientes e profissionais. Os íons hidroxila provenientes dos agentes clareadores são capazes de provocar injúrias de diferentes severidades aos tecidos dentários. Em contato com a polpa, provocam um processo inflamatório que, quando exacerbado, pode levar à necrose pulpar. Avaliar *in vitro* a toxicidade dos agentes clareadores é uma forma de buscar respostas sobre a real segurança do clareamento dental.

Resumo

O objetivo do estudo foi avaliar a citotoxicidade de diferentes agentes clareadores sobre a cultura de células-tronco da polpa dental humana (DPSC). Dezesesseis terceiros molares humanos foram selecionados e seccionados transversalmente 2 mm aquém da JAD. As coroas foram limpas e os agentes clareadores aplicados na superfície oclusal de acordo com os grupos (n=4): PB10 – peróxido de carbamida 10% (PowerBleaching – BM4), 14 aplicações consecutivas de 2 horas; OP10 – peróxido de carbamida 10% (Opalescente PF – Ultradent), 14 aplicações consecutivas de 2 horas; OP38 – peróxido de hidrogênio 38% (Opalescence Boost – Ultradent), 2 aplicações consecutivas de 45 minutos; e C – controle, sem aplicação. Após as aplicações, o meio de cultura condicionado em contato com as coroas dentais, foi aplicado sobre as células DPSC e mantidas em incubadora por 1 h. A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio metiltetrazolium (MTT) e os dados analisados estatisticamente (ANOVA e Teste Tukey com 5% de significância). Houve redução da viabilidade celular para todos os grupos, diferindo estatisticamente do grupo controle ($p<0,05$). Os grupos PB10 e OP10 (59,34% e 61%) diferiram estatisticamente ($p<0,05$) do grupo OP38 (17,40%). Concluiu-se que os agentes clareadores apresentam diferentes níveis de toxicidade à cultura de células-tronco da polpa dental humana. A toxicidade foi dependente do

protocolo de aplicação, sendo mais severa para o agente clareador de alta concentração (PH38%).

Introdução

O clareamento dental é um procedimento terapêutico que, usualmente, envolve a utilização de um oxidante químico que, a partir da sua reação com moléculas cromóforas, altera a natureza de absorção e reflexão da luz sobre a estrutura dental, aumentando o seu valor.^{1,2} Apesar do mecanismo de ação do clareamento não estar completamente elucidado, sabe-se que o peróxido de hidrogênio (agente ativo) sofre uma dissociação iônica e forma íons hidroxila, que pode ser o espécime ativo ou doador de elétrons para formação de radicais livres no processo de clareamento.^{3,4}

Estudos *in vitro* confirmam a capacidade de difusão do peróxido de hidrogênio (PH) para o interior da câmara pulpar.^{5,6} Autores afirmaram que a difusão de PH é dependente do protocolo de aplicação e da composição do agente clareador, sendo a concentração do produto menos importante.^{7,8,9} Quando em contato com o tecido pulpar, os radicais livres podem iniciar um processo inflamatório reversível, clinicamente conhecido por sensibilidade dental.^{10,11,12}

O peróxido de hidrogênio em altas concentrações pode ser ainda mais agressivo, causando danos irreversíveis ao tecido pulpar. Em contato com as células os radicais livres agem sobre a membrana celular, sendo capazes de induzir a morte celular por apoptose.¹³ Costa et al.¹⁴, em um estudo *in situ*, avaliaram que a utilização de PH 38% causou alterações teciduais compatíveis com necrose em incisivos inferiores. Estudos *in vitro*, realizados com células odontoblásticas de camundongo (MDPC-23), observaram que os tratamentos clareadores são tóxicos à cultura de células, sendo a toxicidade diretamente proporcional ao aumento da concentração e do tempo de contato dos agentes clareadores sobre a superfície dental.^{15,16,17,18}

Visto que a penetração de íons hidroxila para o interior da câmara pulpar pode levar à necrose da polpa dental, o objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, os possíveis efeitos citotóxicos de diferentes agentes clareadores sobre a cultura de células-tronco da polpa dental humana. As hipóteses nulas a serem testadas são: (1) a utilização dos agentes clareadores não é capaz de promover danos à cultura de células; (2) os diferentes protocolos de aplicação não alteram os danos à cultura de células.

Materiais e Métodos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (número 847.465). Dezesseis terceiros molares humanos recentemente extraídos foram coletados e armazenados em água destilada. Os dentes foram limpos e avaliados quanto à ausência de anomalias, cáries, restaurações e trincas. As raízes de todos os dentes foram seccionadas aproximadamente 2 mm apical do limite amelodentinário (ISOMET 1000, Buehler Ltda., Lake Bluf, IL, EUA). O tecido pulpar foi removido com curetas e a câmara pulpar lavada com hipoclorito de sódio.

Três diferentes produtos clareadores foram avaliados (Quadro 1) de acordo com o agente clareador (PC 10% ou PH 38%) e o tipo de utilização (caseiro ou consultório). Cada clareador foi inserido em uma seringa graduada de 3 mL. No grupo controle não houve aplicação de clareador.

Quadro 1 – Lote, marca comercial, composição e utilização dos agentes clareadores			
Agente clareador	Marca	Composição/Lote	Utilização
Power Bleaching 10%	BM4	Peróxido de Carbamida 10%; Oxalato de Potássio / Lote: 0010/0815	Caseiro
Opalescence PF	Ultradent	Peróxido de Carbamida 10%; 0,25% Fluoreto de Sódio; 0,5% Nitrato de Potássio / Lote: D00KG	Caseiro
Opalescence Boost	Ultradent	Peróxido de Hidrogênio 38%; < 20% Nitrato de Potássio; < 5% Hidróxido de Potássio; 1,1-1,5% Fluoreto de Sódio/ Lote: D00T3	Consultório

Cultura Celular

Cultura primária de células-tronco da polpa dental humana (DPSC) foi utilizada no estudo. As células foram cultivadas em garrafas plásticas de 75 cm² (Greiner Bio-One GmbH, Austria) em meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Invitrogen, Carlsbad, CA), suplementadas com 10% de soro fetal bovino (Invitrogen), 100 UI/mL e 100 µg/mL, respectivamente, de penicilina e estreptomicina (Invitrogen), e 2 mmol/L de glutamina (Invitrogen). As

células foram mantidas em atmosfera umedecida contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Para realizar o teste de citotoxicidade, 6.10⁴ células/cm² foram semeadas em cada poço de uma placa estéril contendo 12 poços (Greiner Bio-One GmbH, Austria) e mantidas em incubadora por 24 horas para adesão das células.

Tratamento Clareador e Avaliação da Citotoxicidade

Um dispositivo (disco) de resina acrílica foi confeccionado com o objetivo de isolar a superfície oclusal da superfície pulpar do dente e permitir a aplicação do agente clareador sem que houvesse escoamento do material. Para confecção dos discos, um anel de PVC de 2 cm de diâmetro e 2 mm de altura foi apoiado sobre uma placa de acetado com mesmo diâmetro posicionada ao centro da coroa dental, guiando a inclusão de resina acrílica transparente (Dencrilon, Dencril, SP, Brasil).

Após a polimerização da resina acrílica, os conjuntos (dentes e disco) foram autoclavados e posicionadas individualmente em recipientes plásticos contendo 1 mL de DMEM sem soro fetal bovino de forma que apenas a superfície pulpar manteve-se em contato com o meio de cultura. Na superfície oclusal de cada espécime, foram aplicados 0,1 mL de agente clareador, de acordo com os grupos (n=4): GPB10 – PC 10% (PowerBleaching – BM4), 14 aplicações consecutivas de 2 horas; GOP10 – PC 10% (Opalescent PF – Ultradent), 14 aplicações consecutivas de 2 horas; GOP38 – PH 38% (Opalescence Boost – Ultradent), 2 aplicações consecutivas de 45 minutos; GC – controle, sem aplicação. Os produtos e os regimes de aplicações para cada grupo foram sumarizados na Quadro 2.

Quadro 2 – Protocolo de aplicação por grupo			
Grupo	No. aplicações	Tempo	Intervalo
PB10	14	2 horas	10 minutos
OP10	14	2 horas	10 minutos
OP38	2	45 minutos	10 minutos
Controle	Sem aplicação	-	-

Imediatamente após os tratamentos clareadores, o meio de cultura de cada recipiente (1 mL) foi aspirado e aplicado em um dos poços contendo as células DPSC previamente cultivadas. As células em contato com o meio condicionado, contendo agora os componentes do gel clareador degradado que difundiram através do esmalte e dentina dos espécimes, foram mantidas em incubadora com 5% de CO₂, 95% de ar e

temperatura de 37°C por uma hora. O metabolismo celular foi avaliado pelo ensaio Metiltetrazolium (MTT).

Análise do Metabolismo Celular (Ensaio MTT)

A análise do metabolismo celular foi realizada utilizando o ensaio metiltetrazolium (MTT) de acordo com a ISO 10993-5¹⁹. Para esta análise, três coroas dentais de cada grupo experimental foram utilizadas. Após o tempo de contato, o meio condicionado foi aspirado e as células foram incubadas por 4 horas com solução MTT (5mg/mL) a 37°C com 5% de CO₂. Em seguida, os cristais de formazan formados pelas células viáveis foram diluídas com solução de DMSO e a absorbância foi mensurada em uma Multileitora a 570 nm (Infinite M200, Tecan, Suíça). Os valores obtidos em triplicatas foram convertidos em porcentagens de acordo com a absorbância média observada, considerando o grupo controle como 100% de viabilidade. Os dados foram submetidos ao teste ANOVA e o Teste Tukey, com nível de significância de 5%.

Resultados

Os resultados do metabolismo celular obtidos do ensaio MTT estão representados na Figura 1. Houve redução da viabilidade celular para todos os grupos, independente da técnica clareadora. A redução da viabilidade foi de 40,66%, 39,0% e 82,60% para os grupos PB10, OP10 e OP38, respectivamente. Foi observado redução estatística significativa da viabilidade celular para os grupos PB10 (61,0%) e OP10 (59,34%) comparado com o grupo controle (99,65%). O grupo OP38 teve redução significativa da viabilidade celular, diferindo estatisticamente de todos os grupos ($p < 0,05$). Para os agentes clareadores utilizados na técnica caseira (PB10 e OP10) não houve diferença estatística entre os grupos avaliados ($p = 0,1$).

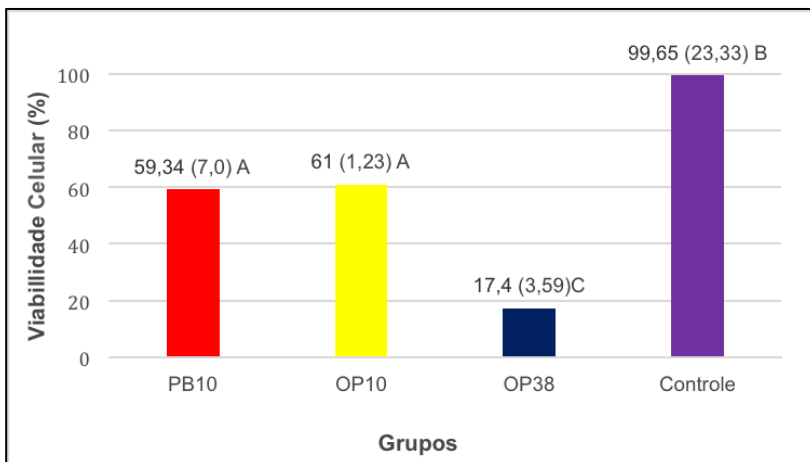


Figura 1 – Gráfico ensaio MTT: o eixo vertical representa a porcentagem da viabilidade celular e o eixo horizontal representa os grupos experimentais. Entre parênteses, desvio padrão. As letras diferentes indicam diferença estatística entre os grupos ($p < 0,05$).

Discussão

Este estudo piloto teve o propósito de investigar os efeitos citotóxicos de agentes clareadores à base de PH 38% e PC 10% nas técnicas de clareamento de consultório e clareamento caseiro, respectivamente. Células-tronco primárias da polpa dentária de dentes humanos (DPSCs) foram cultivadas em placas e colocadas em contato com o meio de cultura condicionado, que continha os componentes clareadores que difundiram pelo esmalte e dentina das coroas dentais humanas, para posterior avaliação da viabilidade celular.

As células DPSCs são uma população de células-tronco mesenquimais provenientes do tecido pulpar humano adulto. Apesar de não haver um consenso na literatura, a maioria dos estudos *in vitro* têm utilizado células da papila de camundongos (células MDPC-23) para avaliação da toxicidade de produtos odontológicos.^{15,16,18,20,21,22,23,24,25,26}

As células MDPC-23 são células imortalizadas da linhagem odontoblástica que apresentam um fenótipo odontoblástico.²⁷ Essas células tem a capacidade de se replicar sem sofrer ou envelhecer durante os processos de cultura, apresentando resultados mais concisos para as pesquisas laboratoriais. No entanto, as células DPSC primárias, mesmo podendo ter variações de acordo com o fenótipo do paciente e sofrerem

envelhecimento durante a cultura, são mais compatíveis com a situação *in vivo*.

Clinicamente, o complexo de proteção do tecido pulpar está ancorado na dentina tubular, por meio das projeções ou processos odontoblásticos provenientes das células que situam-se na periferia da polpa dental, os odontoblastos. Sabe-se que essas células são as primeiras a receber os componentes tóxicos dos materiais odontológicos e, desta forma, sua principal função é iniciar, desenvolver e manter a resposta inflamatória da polpa, representando a primeira linha de defesa.²⁸ Assim como os odontoblastos, as células-tronco da polpa dental são primordiais para a homeostasia do tecido. Em condições normais, essas células-tronco são capazes de diferenciar-se para substituir células adultas que morreram por apoptose. Já em condições de inflamação severa, as células-tronco são recrutadas, proliferando e diferenciando-se em células do tipo odontoblastos que permitem a regeneração do complexo dentina-polpa.²⁹

Outra diferença na metodologia deste estudo foi a utilização de coroas dentais de terceiros molares humanos. Apesar dos terceiros molares apresentarem maior volume e espessura comparado aos dentes anteriores, um estudo clínico mostrou que a espessura do elemento dental não influenciou no aumento da sensibilidade dental.³⁰ A grande maioria dos estudos *in vitro* utilizam discos de esmalte e dentina de dente bovino e não podem extrapolar seus resultados à situação clínica, uma vez que a taxa de difusão de peróxido de hidrogênio é maior para os dentes humanos comparado aos dentes bovinos. Tal resultado pode ser associado à menor espessura de dentina dos dentes humanos, ao diâmetro dos túbulos dentinários dos dentes bovinos ser menor próximo à polpa e à interação do peróxido com o cálcio e fosfato da hidroxiapatita, que pode causar diferentes alterações químicas sobre a estrutura dental dos dentes humanos e bovinos.³¹

O cultivo das células foi realizado em uma capela de fluxo laminar e, após contagem, as células foram semeadas em placas de 12 poços, 24 horas antes da aplicação do meio condicionado. Um desvio padrão alto foi observado para o grupo controle (aproximadamente 23%), pois um dos poços provavelmente não apresentava confluência. Possivelmente um número menor de células foi semeado e, desta forma, após as 24 horas as células não entraram em confluência. Para corrigir este erro, maior cuidado deve ser tomado no momento de pipetar e semear as células.

Para obtenção do meio condicionado, contendo os componentes do gel clareador que difundiram através do esmalte e dentina, as coroas

dentais foram inseridas em recipientes plásticos contendo meio de cultura sem soro fetal bovino. O soro fetal bovino é um suplemento que possibilita a multiplicação e o crescimento da cultura celular. Desta forma, o meio sem soro evitará com que as células sejam capazes de se reabilitar frente aos danos provocados pelos agentes clareadores. A utilização de soro nesta etapa, pode levar a resultados falsos positivos, devido a possibilidade de recuperação das células durante o período de incubação.

No presente estudo piloto, redução significativa da viabilidade celular foi observada para todos os grupos em comparação com o grupo controle, independente das falhas que podem ter ocorrido durante a execução da metodologia. O recipiente plástico utilizado apresentava diâmetro quase 2 vezes maior que o diâmetro do disco e o volume do meio de cultura (1 mL) ficava além das margens do disco. Desta forma, durante a aplicação e remoção dos agentes clareadores, possivelmente ocorreu o escoamento do gel pelas laterais do disco contaminando diretamente o meio de cultura. O ideal seria que o meio ficasse todo contido abaixo do disco, sendo condicionado apenas pelos componentes dos agentes clareadores capazes de difundirem pela estrutura dentária.

Embora algumas modificações sejam fundamentais para utilizar com segurança os resultados obtidos, redução de 82%, 40% e 39% foram observados para os grupos OP38, PB10 e OP10, respectivamente. Resultados similares foram observados em outros estudos que avaliaram a citotoxicidade dos agentes clareadores sobre a cultura de células MDPC-23.^{15,16,18,20,21,23,25,26} Diferente do encontrado neste estudo, a redução da viabilidade celular é mais severa quando utiliza-se células DPSC comparada as células MDPC-23, como encontrado em estudo de Soares et al.³². Os autores comparam o efeito citotóxico do PH sobre a cultura de células DPSC e células MDPC-23. Para ambas as linhagens celulares houve redução da viabilidade celular e alteração da morfologia proporcional à concentração e os períodos de aplicação. No entanto, observou-se redução mais intensa na viabilidade das células DPSC (96,9%) quando comparada ao cultivos de células MDPC-23 (54,5%), imediatamente ao clareamento com PH 35% por 45 minutos.

Um estudo controverso avaliou a aplicação de PH 35% em discos de esmalte e dentina de dentes bovinos e observou diminuição do metabolismo das células MDPC-23 em 92%. No entanto, os autores realizaram a incubação do meio de cultura condicionado por 24 horas, resultando em efeito tóxico mais elevado comparado a este e os demais estudos em que o meio condicionado foi aplicado por apenas 1 hora.²⁶ Apesar deste estudo ter utilizado células DPSCs, o tempo de contato

pode alterar de forma significativa o resultado da pesquisa sendo de extrema importância o controle deste fator.

Ao comparar o efeito tóxico das diferentes técnicas clareadoras, observou-se redução estatística significativa entre os grupos caseiro (PC 10%) e consultório (PH 38%). A redução da viabilidade foi proporcional à concentração e à frequência da aplicação dos agentes clareadores. Estudos com resultados similares concluíram que quanto maior a concentração e mais longo o tempo de aplicação maior a redução da viabilidade celular imediatamente após a aplicação.^{17,33}

Mesmo podendo ter ocorrido extravasamento do agente clareador, o PC 10% teve percentual de toxicidade menor que o PH 38% quando em contato direto com as células DPSC. Duque et al.³⁴ observaram que a aplicação de PC 10% obteve alteração de cor satisfatória ($\Delta E > 3$) e redução significativa da citotoxicidade (redução da viabilidade de 24,6%) comparada a uma aplicação de PH 35% (redução de 92,6%). Desta forma, a aplicação de PC pode ser considerada mais eficaz e segura compara a aplicação de PH.

No tratamento caseiro foram avaliados agentes clareadores à base de PC 10% (PB10 e OP10). Ambos os grupos tiveram redução da viabilidade celular, diferindo estatisticamente do grupo controle. Quando avaliadas as diferentes composições, não houve diferença estatística entre os grupos. Resultado similar foi avaliado por Soares et al.¹⁵. Os autores observaram que independente do número de aplicações, o gel PC 10% não causou efeitos citotóxicos à cultura de células MDPC-23. Já Lima et al.¹⁶, ao avaliar a aplicação consecutiva de PC 10%, observaram que a aplicação consecutiva do PC produziu toxicidade severa à cultura de células.

Poucos estudos *in vitro* foram realizados para avaliação da citotoxicidade de agentes clareadores à base de peróxido de carbamida devido a dificuldade em reproduzir a técnica por dias consecutivos. No presente estudo, a técnica de clareamento caseiro foi realizada em dois dias, sendo aplicações consecutivas de 2 horas, o qual levou a um efeito cumulativo do tratamento e, consequentemente, toxicidade mais severa. Resultado similar foi observado por Marson et al.⁹ que avaliaram a difusão de peróxido pela estrutura dental após diferentes tempos de aplicação. Ao aumentar o tempo de contato do agente clareador com a superfície dental de 15 para 45 minutos, observou-se que a difusão de peróxido foi intensificada.

A aplicação consecutiva, além de intensificar o efeito tóxico dos agentes clareadores, não permite a recuperação das células entre uma sessão e outra. Um estudo realizado por Soares et al.¹⁸ observou que as

células MDPC-23 são capazes de recuperar sua função ao longo do tempo, após a aplicação de agentes clareadores. Soares et al.¹⁷ avaliaram a citotoxicidade imediata e a recuperação (após 72 horas) das células-tronco da polpa dental humana submetidas ao clareamento de consultório com PH. Os autores observaram que, quanto maior a concentração e mais longa a frequência de aplicação, maior é a redução da viabilidade celular e menor é a capacidade de recuperação das células.

O presente estudo *in vitro* buscou simular as condições mais próximas o possível da realidade clínica, porém os dados não podem ser extrapolados. Sabe-se que o dente vital apresenta condições não reproduzíveis como: fluxo de fluido tubular produzido pela pressão pulpar interna; prolongamentos odontoblásticos; e outros componentes tubulares, que podem reduzir a difusão de peróxido de hidrogênio pelos tubos dentinários.³⁵ Além disso, a polpa dental possui um sistema linfático que participa na eliminação de produtos externos capazes de atingir a polpa por difusão. O estresse oxidativo causado pela presença de radicais livres pode ainda ativar o sistema de defesa celular liberando uma série de agentes endógenos antioxidantes, como peroxidases e catalases, capazes de degradar o peróxido de hidrogênio e reduzir os danos ao tecido.³⁶ Por isto, mais estudos *in vivo* e *in situ* devem ser conduzidos para avaliar não só a eficácia clareadora e a sensibilidade dental, mas também a resposta do tecido pulpar frente as diferentes técnicas clareadoras.

Conclusão

— Os agentes clareadores apresentaram diferentes níveis de citotoxicidade à cultura de células-tronco da polpa dental humana. A toxicidade foi dependente do protocolo de aplicação, sendo mais severa para o agente clareador de alta concentração (PH 38%).

Referências

1. American Association of Endodontics (1998) Glossary of Contemporary Terminology for Endodontics *American Dental Association (ADA)* 6^{ed} Chicago.
2. Berga-Caballero A, Forner-Navarro L & Amengual-Lorenzo J (2006) At-home vital bleaching: a comparison of hydrogen peroxide and carbamide peroxide treatments *Medicina Oral Patologia Oral y Cirurgia Bucal* 11(1) 94-99.

3. Joiner A (2006) The bleaching of teeth: a review of the literature *Journal of Dentistry* **34**(7) 412-419.
4. Minoux M & Seraty R (2008) Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review *Quintessence International* **39**(8) 645-59.
5. Gökay O, Tunçbilek M & Ertan R (2000) Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin *Journal of Oral Rehabilitation* **27**(5) 428-431.
6. Benetti AR, Valera MC, Mancini MN, Miranda CB & Balducci I (2004) In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber *International Endodontic Journal* **37**(2) 120-124.
7. ¹Soares DG, Basso FG, Pontes EC, Garcia LDAF, Hebling J & De Souza Costa CA (2014) Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H₂O₂ diffusion through enamel and dentine *Journal of Dentistry* **42**(3) 351-358.
8. Mena-Serrano A, Parreiras S, Nascimento ED, Borges C, Berger S, Loguercio A & Reis A (2015) Effects of the concentration and composition of in-office bleaching gels on hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber *Operative Dentistry* **40**(2) 76-82.
9. Marson FC, Gonçalves RS, Silva CO, Cintra LT, Pascotto RC, Santos PH & Briso AL (2015) Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of diferente bleaching products *Opertative Dentistry* **40**(1) 72-79.
10. Dahl JE & Pallesen U (2003) Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* **14**(4) 292-304.
11. Kihn PW (2007) Vital tooth whitening *Dental Clinics of North America* **51**(2) 319-331.
12. Sulieman MA (2008) An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy *Periodontology 2000* **48** 148-169.
13. Costa CA & Huck C (2006) Cytotoxic effects and biocompatibility

of bleaching agents used in dentistry. A literature review *Revista Odontológica do Brasil Central* **15(39)** 3-14.

14. Costa CA, Riehl H, Kina JF, Sacono NT & Hebling J (2010) Human pulp responses to in-office tooth bleaching *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* **109(4)** 59-64.

15. Soares DG, Ribeiro AP, Sacono NT, Coldebella CR, Hebling J & Costa CA (2011) Transenamel and transdentinal cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells *International Endodontic Journal* **44(2)** 116-125.

16. Lima AF, Ribeiro AP, Soares DG, Sacono NT, Hebling J, De Souza Costa CA (2013) Toxic effects of daily application of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells *Acta Odontologica Scandinavica* **71(5)** 1319-1325.

17. ¹Soares DG, Basso FG, Hebling J & De Souza Costa CA (2015) Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability after indirect exposition to alternative in-office bleaching strategies *Clinical Oral Investigations* **19(5)** 1013-1020.

18. Soares DG, Marcomini N, Basso FG, Pansani TN, Hebling J & De Souza Costa CA (2016) Indirect cytocompatibility of a low concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells *International Endodontic Journal* **49(1)** 26-36.

19. ISO-Standards (2009) ISO 10993-5 Biological Evaluation of Medical Devices: Tests for In Vitro Cytotoxicity *Geneve: International Organization for Standardization* **3rd edition** 1-34.

20. Coldebella CR, Ribeiro AP, Sacono NT, Trindade FZ, Hebling J & Costa CA (2009) Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells *Brazilian Dental Journal* **20(4)** 267-274.

21. De Almeida LC, Soares DG, Gallinari MO, De Souza Costa CA, Dos Santos PH & Briso AL (2015) Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols *Clinical Oral Investigations* **19(3)** 673-680.

22. De Lima AF, Lessa FC, Gasparoto Mancini MN, Hebling J, De Souza Costa CA, Marchi GM (2009) Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23 *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* **9(2)** 907-912.
23. Dias Ribeiro AP, Sacono NT, Lessa FC, Nogueira I, Coldebella CR, Hebling J & De Souza Costa CA (2009) Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDPC-23 cells *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* **108(3)** 458-464.
24. Lima AF, Lessa FC, Mancini MN, Hebling J, Costa CA, Marchi GM Transdental protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology* **109(4)** 70-76.
25. Soares DG, Ribeiro AP, Da Silveira Vargas F, Hebling J & De Souza Costa CA (2013) Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel *Clinical Oral Investigations* **17(8)** 1901-1909.
26. Trindade FZ, Ribeiro AP, Sacono NT, Oliveira CF, Lessa FC, Hebling J & Costa CA (2009) Trans-enamel and trans-dental cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications *International Endodontic Journal* **42(6)** 516-524.
27. Hanks CT, Sun ZL, Fang DN et al. (1998) Cloned 3T6 cell line from CD-1 mouse fetal molar dental papillae *Connective Tissue Research* **37** 233-49.
28. Farges JC, Keller JF, Carrouel F, Durand SH, Romeas A, Bleicher F et al. (2009) Odontoblasts in the dental pulp immune response *Journal of Experimental Zoology Part B Molecular and Developmental Evolution* **312B** 425-36.
29. Simon SR, Berdal A, Cooper PR, Lumley PJ, Tomson PL & Smith AJ (2011) Dentin-pulp complex regeneration: from lab to clinic *Advances in Dental Research* **23** 340-345.

30. Moncada G, Sepúlveda D, Elphick K, Contente M, Estay J, Bahamondes V, Fernandez E, Oliveira OB & Martin J (2013) Effects of light activation, agent concentration, and tooth thickness on dental sensitivity after bleaching *Operative Dentistry* **38(5)** 467-476.
31. Camargo SE, Valera MC, Camargo CH, Gasparoto Mancini MN & Menezes MM (2007) Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique *Journal of Endodontics* **33(9)** 1074-1077.
32. ²Soares DG, Basso FG, Hebling J & De Souza Costa CA (2014) Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy *Jornal of Dentistry* **42(2)** 185-198.
33. ²Soares DG, Basso FG, Scheffel DS, Hebling J & De Souza Costa CA (2015) Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel *Archives Oral Biology* **60(9)** 1428-1436.
34. Duque CC, Soares DG, Basso FG, Hebling J & de Souza Costa CA (2014) Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel *Clinical Oral Investigation* **18(6)** 1631-1637.
35. Sauro S, Pashley DH, Montanari M et al. (2007) Effect of simulated pulpal pressure on dentin permeability and adhesion of self-etch adhesives *Dental Materials* **23** 705-713.
36. Esposito P, Varvara G, Murmura G, Terlizzi A & Caputi S (2003) Ability of healthy and inflamed human dental pulp to reduce hydrogen peroxide *European Journal of Oral Sciences* **111** 454-456.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho buscou descrever e estabelecer uma metodologia capaz de avaliar *in vitro* a toxicidade de agentes clareadores sobre a cultura de células-tronco da polpa dental humana. Concluiu-se que os agentes clareadores foram citotóxicos às células DPSC, sendo a toxicidade dependente do protocolo de aplicação e mais severa para o agente clareador de consultório (PH38%). Apesar dos resultados obtidos, esta metodologia necessita de aprimoramento para que resultados mais precisos possam ser alcançados.

BIBLIOGRAFIA

AMERICAN ASSOCIATION OF ENDODONTICS. American Dental Association (ADA). **Glossary of Contemporary Terminology for Endodontics**. 6. ed, Chicago, 1998.

BASTING, R.; AMARAL, F.; FRANÇA, F.; FLÓRIO, F. **Clinical comparative study of the effectiveness of and tooth sensitivity to 10% and 20% carbamide peroxide home-use and 35% and 38% hydrogen peroxide in-office bleaching materials containing desensitizing agent**. Oper Dent., v. 37, n. 5, p. 464-73, set/out. 2012.

BENETTI, A.R.; VALERA, M.C.; MANCINI, M.N.; MIRANDA, C.B.; BALDUCCI, I. **In vitro penetration of bleaching agents into the pulp chamber**. Int Endod J., v. 37, n. 2, p. 120-4, 2004.

BERNARDON, J. K. et al. **Clinical performance of vital bleaching techniques**. Oper. Dent., v. 35, n. 1, p. 3-10, jan-fev. 2010.

BOWLES, W.H.; UGWUNERI, Z. **Pulp chamber penetration by hydrogen peroxide following vital bleaching procedures**. J Endod., v. 13, n. 8, p.375-7, ago. 1987.

BROWNING, W. D. et al. **Duration and timing of sensitivity related to bleaching**. J. Esthet. Restor. Dent., v. 19, n. 5, p. 256-64, 2007.

CAMARGO, S.E., VALERA, M.C.; CAMARGO, C.H.; GASPAROTO MANCINI, M.N.; MENEZES, M.M. **Penetration of 38% hydrogen peroxide into the pulp chamber in bovine and human teeth submitted to office bleach technique**. J Endod., v.33, n. 9, p. 1074-7, set. 2007.

CAVIEDES-BUCHELI J, ARIZA-GARCÍA G, RESTREPO-MÉNDEZ S, RÍOS-OSORIO N, LOMBANA N, MUÑOZ HR. **The effect of tooth bleaching on substance P expression. In human dental pulp**. J Endod., v. 34, n. 12, p. 1462-65, 2008.

CINTRA, L.T.; BENETTI, F.; DA SILVA, F.A.C.; FERREIRA, L.L.; GOMES-FILHO, J.E.; ERVOLINO, E.; RAHAL, V.; BRISO, A.L. **The number of bleaching sessions influences pulp tissue damage in rat teeth**. J Endod., v. 39, n. 12, p. 1576-80, 2013.

COHEN, S.C. **Human pulpal response to bleaching procedures on vital teeth.** J Endod., v. 5, n. 5, p. 134-8, maio 1979.

COLDEBELLA, C.R.; RIBEIRO, A.P.; SACONO, N.T.; TRINDADE, F.Z.; HEBLING, J.; COSTA, C.A. **Indirect cytotoxicity of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on cultured odontoblast-like cells.** Braz Dent J., v. 20, n. 4, p. 267-74, 2009.

COOPER, J.S.; BOKMEYER, T.J.; BOWLES, W.H. **Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents.** J Endod., v. 18, n. 7, p. 315-7, jul. 1992.

CORDEIRO, M.M.; DONG, Z.; KANEKO, T.; ZHANG, Z.; MIYAZAWA, M.; SHI, S.; SMITH, A.J.; NÖR, J.E. **Dental pulp tissue engineering with stem cells from exfoliated deciduous teeth.** J Endod., v. 34, n. 8, p. 962-9, ago. 2008.

COSTA, C.A.; HUCK, C. **Cytotoxic effects and biocompatibility of bleaching agents used in dentistry. A literature review.** Robrac., v. 15, n. 39, p. 3-14, 2006.

COSTA, C.A.; RIEHL, H.; KINA, J.F.; SACONO, N.T.; HEBLING, J. **Human pulp reponses to in-office tooth bleaching.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 109, n. 4, p. 59-64, 2010.

DAHL, J.E.; PALLESEN, U. **Tooth bleaching--a critical review of the biological aspects.** Crit Rev Oral Biol Med., v. 14, n. 4, p. 292-304, 2003.

DE ALMEIDA, L.C.; SOARES, D.G.; GALLINARI, M.O.; DE SOUZA COSTA, C.A.; DOS SANTOS, P.H.; BRISO, A.L. **Color alteration, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity caused by in-office bleaching protocols.** Clin Oral Investig., v. 19, n. 3, p. 673-80, 2015.

DE LIMA, A.F.; LESSA, F.C.; GASPAROTO MANCINI, M.N.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A.; MARCHI, G.M. **Cytotoxic effects of different concentrations of a carbamide peroxide bleaching gel on odontoblast-like cells MDPC-23.** J Biomed Mater Res B Appl Biomater., v. 90, n. 2, p. 907-12, 2009.

DIAS RIBEIRO, A.P.; SACONO, N.T.; LESSA, F.C.; NOGUEIRA, I.; COLDEBELLA, C.R.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Cytotoxic effect of a 35% hydrogen peroxide bleaching gel on odontoblast-like MDP-23 cells.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 108, n. 3, p. 458-64, 2009.

DUQUE, C.C.; SOARES, D.G.; BASSO, F.G.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Bleaching effectiveness, hydrogen peroxide diffusion, and cytotoxicity of a chemically activated bleaching gel.** Clin Oral Investig., v. 18, n. 6, p. 1631-1637, 2014.

EGUSA, H.; SONOYAMA, W.; NISHIMURA, M.; ATSUTA, I.; AKIYAMA, K. **Stem cells in dentistry--Part II: Clinical applications.** J Prosthodont Res., v. 56, n. 4, p. 229-48, 2012.

GÖKAY, O.; TUNÇBILEK, M.; ERTAN, R. **Penetration of the pulp chamber by carbamide peroxide bleaching agents on teeth restored with a composite resin.** J Oral Rehabil., v. 27, n. 5, p. 428-31, 2000.

GRONTHOS, S.; MANKANI, M.; BRAHIM, J.; ROBEY, P.G.; SHI, S. **Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo.** Proc Natl Acad Sci U S A., v. 97, n. 25, p. 13625-30, 2000.

HAYWOOD, V.B.; HEYMANN, H.O. **Nightguard vital bleaching.** Quintessence Int., v. 20, p. 173-6, 1989.

ISO-STANDARDS. **ISO 10993-5 Biological Evaluation of Medical Devices: Tests for In Vitro Cytotoxicity.** Geneve: International Organization for Standardization, 3 ed, p. 1-34, 2009.

JOINER, A. **The bleaching of teeth: a review of the literature.** J Dent., v. 34, n. 7, p. 412-9, ago. 2006.

KIHN, P.W. **Vital tooth whitening.** Dent Clin North Am., v. 51, n. 2, p. 319-31, abr. 2007.

KINA, J.F.; HUCK, C.; RIEHL, H.; MARTINEZ, T.C.; SACONO, N.T.; RIBEIRO, A.P.; COSTA, C.A. **Response of human pulps after professionally applied vital tooth bleaching.** Int Endod J., v. 43, n. 7, p. 572-80, 2010.

KWON, S.R.; OYOYO, U.; LI, Y. **Effect of light activation on tooth whitening efficacy and hydrogen peroxide penetration: an in vitro study.** J Dent., v. 41, supl. 3, p. 39-45, ago. 2013.

LIMA, A.F.; LESSA, F.C.; MANCINI, M.N.; HEBLING, J.; COSTA, C.A.; MARCHI, G.M. **Transdentinal protective role of sodium ascorbate against the cytopathic effects of H₂O₂ released from bleaching agents.** Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod., v. 109, n. 4, p. 70-6, abr. 2010.

LIMA, A.F.; RIBEIRO, A.P.; SOARES, D.G.; SACONO, N.T.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Toxic effects of daily applications of 10% carbamide peroxide on odontoblast-like MDPC-23 cells.** Acta Odontol Scand., v. 71, n. 5, p. 1319-25, 2013.

LUCIER, R.N.; ETIENNE, O.; FERREIRA, S.; GARLICK, J.A.; KUGEL, G.; EGLES, C. **Soft-tissue alterations following exposure to tooth-whitening agents.** J Periodontol., v. 84, n. 4, p. 513-19, 2013.

MARSON, F.C.; GONÇALVES, R.S.; SILVA, C.O.; CINTRA, L.T.; PASCOTTO, R.C.; SANTOS, P.H.; BRISO, A.L. **Penetration of hydrogen peroxide and degradation rate of diferente bleaching products.** Oper Dent., v. 40, n. 1, p. 72-9, jan-fev. 2015.

MENA-SERRANO, A.; PARREIRAS, S.; NASCIMENTO, E.D.; BORGES, C.; BERGER, S.; LOGUERCIO, A.; REIS, A. **Effects of the concentration and composition of in-office bleaching gels on hydrogen peroxide penetration into the pulp chamber.** Oper Dent., v. 40, n. 2, p. 76-82, 2015.

MINOUX, M.; SERFATY, R. **Vital tooth bleaching: biologic adverse effects-a review.** Quintessence Int., v. 39, n. 8, p. 645-59, 2008.

MIURA, M.; GRONTHOS, S.; ZHAO, M.; LU, B.; FISHER, L.W.; ROBEY, P.G.; SHI, S. **SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth.** Proc Natl Acad Sci U S A., v. 100, n. 1, p. 5807-12, 2003.

MONCADA, G.; SEPÚLVEDA, D.; ELPHICK, K.; CONTENTE, M.; ESTAY, J.; BAHAMONDES, V.; FERNANDEZ, E.; OLIVEIRA, O.B.; MARTIN, J. **Effects of light activation, agent concentration, and tooth thickness on dental sensitivity after bleaching.** Oper Dent., v. 38, n. 5, p. 467-76, set-out. 2013.

PATRI, G.; AGNIHOTRI, Y.; RAO, S.R.; LAKSHMI, N.; DAS, S. **An in vitro spectrophotometric analysis of the penetration of bleaching agent into the pulp chamber of intact and restored teeth.** J Clin Diagn Res., v. 7, n. 12, p. 3057-9, 2013.

ROBERTSON, W.D.; MELFI, R.C. **Pupal response to vital bleaching procedures.** J Endod., v. 6, n. 7, p. 645-9, jul. 1980.

RODERJAN DA, STANISLAWCZUK R, HEBLING J, COSTA CA, REIS A, LOGUERCIO AD. **Response of human pulps to diferente in-office bleaching techniques: Preliminary findings.** Braz Dent J., v. 26, n. 3, p. 242-8, maio-jun. 2015.

SOARES, D.G.; RIBEIRO, A.P.; SACONO, N.T.; COLDEBELLA, C.R.; HEBLING, J.; COSTA, C. A. **Transenamel and trans dentinal cytotoxicity of carbamide peroxide bleaching gels on odontoblast-like MDPC-23 cells.** Int Endod J., v. 44, n. 2, p. 116-25, 2011.

SOARES, D.G.; RIBEIRO, A.P.; DA SILVEIRA VARGAS, F.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Efficacy and cytotoxicity of a bleaching gel after short application times on dental enamel.** Clin Oral Investig., v. 17, n. 8, p. 1901-09, 2013.

¹SOARES, D.G.; BASSO, F.G.; PONTES, E.C.; GARCIA, L.D.A.F.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Effective tooth-bleaching protocols capable of reducing H(2)O(2) diffusion through enamel and dentine.** J Dent., v. 42, n. 3, p. 351-8, 2014.

²SOARES, D.G.; BASSO, F.G.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Concentrations of and application protocols for hydrogen peroxide bleaching gels: effects on pulp cell viability and whitening efficacy.** J Dent., v. 42, n. 2, p. 185-98, fev. 2014.

¹SOARES, D.G.; BASSO, F.G.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Immediate and late analysis of dental pulp stem cells viability**

after indirect exposition to altern ative in-office bleaching strategies. Clin Oral Investig., v. 19, n. 5, p. 1013-20, jun. 2015.

²SOARES D.G.; BASSO, F.G.; SCHEFFEL, D.S.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Responses of human dental pulp cells after application of a low-concentration bleaching gel to enamel.** Arch Oral Biol., v. 60, n. 9, p. 1428-36, set. 2015.

SOARES, D.G.; MARCOMINI, N.; BASSO, F.G.; PANSANI, T.N.; HEBLING, J.; DE SOUZA COSTA, C.A. **Indirect cytocompatibility of a low concentration hydrogen peroxide bleaching gel to odontoblast-like cells.** Int Endod J., v. 49, n. 1, p. 26-36, jan. 2016.

SULIEMAN, M.A. **An overview of tooth-bleaching techniques: chemistry, safety and efficacy.** Periodontol 2000, v. 48, p. 148-69, 2008.

THITINANTHAPAN, W.; SATAMANONT, P.; VONGSAVAN, N. **In vitro penetration of the pulp chamber by three brands of carbamide peroxide.** J Esthet Dent., v. 11, n. 5, p. 259-64, 1999.

TRINDADE, F.Z.; RIBEIRO, A.P.; SACONO, N.T.; OLIVEIRA, C.F.; LESSA, F.C.; HEBLING, J.; COSTA, C.A. **Trans-enamel and trans-dentinal cytotoxic effects of a 35% H₂O₂ bleaching gel on cultured odontoblast cell lines after consecutive applications.** Int Endod J., v. 42, n. 6, p. 516-24, 2009.

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre Esclarecido



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

As informações contidas neste documento têm o objetivo de firmar, por escrito, que o voluntário autoriza a sua participação com pleno consentimento da natureza dos procedimentos e riscos a que se submeterá, com capacidade de livre arbítrio e sem qualquer coação. Os voluntários devem estar conscientes de que seu(s) dente(s) será(serão) extraído(s) por indicação terapêutica para a melhoria da sua saúde, como documentado em seu prontuário. Embora o procedimento cirúrgico não seja realizado pela pesquisadora, eventualmente alguns pacientes poderão sentir um desconforto, dor e rubor, e ocasionalmente pode ocorrer pequeno sangramento na região em que será(serão) realizada(s) a(s) extração(ões). Em caso de intercorrências, os pacientes serão orientados e receberão auxílio da pesquisadora a qualquer momento. Será garantido o sigilo das informações e a privacidade na identificação dos participantes. Os voluntários terão total liberdade de recusar a doação a qualquer momento e sem punição.

Eu, _____, portador do CPF _____ e/ou RG _____ declaro estar ciente do exposto e desejo doar o(s) dente(s) _____ para pesquisa, previamente aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFSC, baseado na resolução 466/2012.

Assinatura do Doador ou
Responsável

Cirurgião-Dentista (CRO)

Florianópolis, _____ de _____ de _____

Para efetuar qualquer esclarecimento sobre a doação, entrar em contato com
Jussara K. Bernardon - telefone (48)84350607 ou Carolina Taguchi - telefone
(48) 99562651.

ANEXO A – Parecer Comitê de Ético em Pesquisa com Seres Humanos

MATERNIDADE CARMELA
DUTRA/SC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO DA DIFUSÃO DE ÍONS HIDROXILA PROVENIENTES DO CLAREAMENTO DENTAL

Pesquisador: Jussara Karina Bernardon

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 35023414.8.0000.0114

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 847.465

Data da Relatoria: 13/11/2014

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram todos apresentados, preenchidos, assinados, datados e postados na Plataforma Brasil.

O TCLE - Modelo de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido apresentado pelo pesquisador atende a contento o que dispõe a Res. CNS/MS n° 196/96 atualizada pela Res. CNS/MS n° 466/12 e permite aos participantes (sujeitos de pesquisa) compreender os riscos da exodontia.

Recomendações:

Esta pesquisa possui relevância científica e nenhum impedimento ético estando a mesma Aprovada por estar de acordo com a Resolução 466/12

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Rua Imã Benwarda 208

Bairro: Centro

CEP: 88.015-270

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3251-7626

Fax: (48)3251-7626

E-mail: cep_mcd@hotmail.com